

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos
expostos a medicamentos endodônticos.**

Aracaju, SE
Fevereiro/2015

GUSTAVO DANILO NASCIMENTO LIMA

**Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos
expostos a medicamentos endodônticos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr^a. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Aracaju, SE
2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

L732 Lima, Gustavo Danilo Nascimento
 Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de
 fibroblastos expostos a medicamentos endodônticos / Gustavo
 Danilo Nascimento Lima ; orientadora Maria Amália Gonzaga
 Ribeiro. – Aracaju, 2015.
 40 f.

 Dissertação (mestrado em Odontologia)– Universidade Federal
 de Sergipe, 2015.

 1. Odontologia. 2. Citotoxicidade. 3. Endodontia. 4. Fototerapia.
 5. Fibroblastos. I. Ribeiro, Maria Amália Gonzaga, orient. II.
 Título.

CDU 616.314

AGRADECIMENTOS

Meu muito Obrigado:

A Deus por toda proteção, força, paciência e inspiração concedidas.

Aos meus pais que sempre incentivaram meu aperfeiçoamento e crescimento profissional. As minhas irmãs, Nayara e Vitória, pela alegria e total energia transmitidas durante os 24 meses de realização desse curso. Amo muito vocês!

A minha namorada Carla Tainan, presente em todos os momentos da minha vida (inclusive ficando comigo nos finais de semana, até durante algumas madrugadas sem reclamar!). Quero realmente te agradecer, sem você essa caminhada teria sido muito mais árdua. Te amo!

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro, pela confiança, paciência, atenção, conhecimentos transmitidos, exemplo de profissional, tenho muito a te agradecer professora.

A todos que fazem parte do Laboratório de Cultivo celular (NCTBIO) da UFPEL. Em especial, aos Professores Flávio Demarco e Sandra Tarquínio que me receberam tão bem e” abriram as portas” do laboratório para que eu pudesse trabalhar. Meu muito obrigado pela confiança.

De forma mais que especial ao Prof. Dr. Marcus Conde, o mestrando Alexandre Chisini e o téc. de laboratório Leandro, por todo empenho e paciência “do mundo” em me explicar como tudo funcionava, pela tranquilidade, parceria, atenção e disponibilidade durante todo o período que estive na UFPEL para realização da parte experimental desta pesquisa, vocês foram muito importantes para que este trabalho pudesse ser realizado. Ainda espero vocês por aqui...rsrsrs

Ao Professor Dr. André Luis Faria e Silva pela ajuda (aliás, mais que ajuda!) na realização de uma das partes mais difícil da dissertação: a estatística.

Aos professores Dr. Ricardo Albuquerque, Dr. André Faria e Silva, Dr. Paulo Saquete e Dr. Antônio Pinheiro, que aceitaram compor minha banca de qualificação e defesa, pelas sugestões e análises significativas às quais tentarei atender na versão definitiva do texto.

A todas as turmas da disciplina de Endodontia da UFS que me deram a oportunidade de conhecer a vida acadêmica, agora de um novo ângulo, como mestrando.

Aos meus amigos do curso de Mestrado pelo carinho, amizade e apoio recebidos. O percurso foi longo e pedregoso, mas chegamos ao final, todos com o título de VENCEDORES. Parabéns!!!!

Foi um longo caminho percorrido...

“E aprendi que se depende sempre

De tanta, muita, diferente gente

Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas.

É tão bonito quando a gente entende

Que a gente é tanta gente

Onde quer que a gente vá.

É tão bonito quando a gente sente

Que nunca está sozinho Por mais que pense estar...”

(Caminhos do coração – Gonzaguinha.)

“A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada” (provérbio africano).

Meu muito OBRIGADO!

Resumo

Na endodontia, para promover a eliminação de microrganismos que resistiram a etapa de preparo do canal, torna-se imperioso o uso de medicações intracanaís. No entanto, os produtos da degradação desses materiais, quando em contato com a região periapical, podem causar irritação química e inflamação levando a um retardo o processo cicatricial. Na busca de estratégias que minimizem este problema foi proposto a associação com a fotobiomodulação a laser (FTL). Desta forma, o objetivo deste estudo, *in vitro*, foi avaliar o efeito da associação entre a FTL e medicamentos intracanaís na viabilidade de fibroblastos em diferentes tempos de exposição. Para o teste citotóxico foi estabelecido a cultura de fibroblastos 3T3 com concentração celular de 2×10^4 células/ poço e volume de 200 μ L/ poço em placas de 96 poços. Foram utilizados dois medicamentos e divididos em grupos experimentais: hidróxido de cálcio - água destilada (HC), iodofórmio - água destilada (IO) e grupo controle com células e meio de cultura (CTR). Sendo todos estes grupos associados ou não a fotobiomodulação a laser. Eluatos dos medicamentos endodônticos foram preparados e colocados em contato com as células por períodos de 24h, 48h e 72h. Com relação a irradiação a laser foram realizadas duas sessões com intervalo de 6 horas, com laser AlGaInP (λ 660nm, 10mW, 3J/cm², 12s por poço). Após cada tempo experimental, foi executado o ensaio colorimétrico, utilizando o reagente metiltetrazólio (MTT). A leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro, utilizando a densidade óptica de 540nm. Para análise estatística aplicou-se ANOVA de 3-vias seguido pelo teste de *Tukey*. Nos resultados a interação tripla não foi significativa ($P=0,053$), mas todas as interações duplas realizadas foram. Laser x medicação ($P = 0,002$); laser x tempo ($P < 0,001$); e medicação x tempo ($P < 0,001$). O CRT quando irradiado, apresentou diferença do não irradiado com uma maior taxa de viabilidade celular. Independente do uso da FTL, o controle teve maior viabilidade celular e HC a menor, apresentando-se como o mais citotóxico. Em 24h, o uso do laser reduziu a viabilidade celular, enquanto que o inverso foi observado na avaliação de 72h. Um aumento da citotoxicidade dos medicamentos endodônticos foi observado com o passar do tempo. Concluiu-se que todas medicações testadas apresentaram-se como citotóxicas, promovendo uma diminuição da viabilidade celular com o passar dos períodos experimentais, e quando associadas a FTL, foi observado uma maior viabilidade celular para 72h.

Palavras-chaves: Citotoxicidade; Endodontia; Fototerapia; Fibroblastos

Abstract

In endodontics, to promote the elimination of microorganisms that resisted the preparation step of the canal, it becomes important to use of intracanal medications. However, the degradation products of these materials when in contact with the periapical region can cause chemical irritation and inflammation, leading to a delay in the healing process. The association with laser photobiomodulation (FTL) has been proposed as a strategy to minimize this problem. Thus, the aim of this in vitro study was to evaluate the association between the laser photobiomodulation (FTL) and intracanal medications on the viability of fibroblasts in different exposure times. For the cytotoxic test was established culture with 3T3 fibroblasts cell density of 2×10^4 cells / well in 96 well plates. Two medications and divided into experimental groups were used: calcium hydroxide - distilled water (HC), iodoform - distilled water (IO) and control group with cells and culture medium (CTR), with or without laser photobiomodulation. Eluates of endodontic medications were prepared and placed in contact with the cells for periods of 24, 48 and 72 hours. In relation to laser irradiation were two sessions with an interval of 6 hours, with AlGaInP laser emitting radiation 660nm, 10mW of power density, energy density of 3 J / cm² for 12 s per well. After each experimental time, the colorimetric assay was executed using the metiltetrazólio reagent (MTT). The reading of the plates was performed at the spectrophotometer, using the optical density at 540 nm. Statistical analysis was applied 3-way ANOVA followed by Tukey test. In the results the triple interaction was not significant ($P = 0.053$), but all double interactions were laser x medication ($P = 0.002$); Laser x time ($P < 0.001$); and medication x time ($P < 0.001$). The CRT when irradiated, was different from the non-irradiated with a higher cell viability rate. Independent of use of FTL, the control had higher cell viability and HC smaller, presenting itself as the most cytotoxic. At 24h, the use of lasers reduced cell viability, whereas the opposite was observed in the evaluation of 72h. An increase in the cytotoxicity of endodontic medications was observed with the passage of time. It was concluded that all tested medications are cytotoxic promoting a decrease in cell viability over the experimental periods, and when associated with FTL, was promoted increased cell viability for 72 hours.

Keywords: Cytotoxicity; Endodontics; Phototherapy; Fibroblasts

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema do plaqueamento realizado..... | 16 |
| Figura 2. Manipulação da pasta de hidróxido de cálcio-água destilada..... | 17 |
| Figura 3. Manipulação da pasta de iodofórmio-glicerina..... | 17 |
| Figura 4. Confecção dos corpos de prova | 17 |
| Figura 5. Esterilização dos corpos de prova..... | 18 |
| Figura 6 Padronização do experimento..... | 20 |
| Figura 7. Espectofotômetro..... | 22 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|-----|
| Quadro 1. Descrição dos grupos e dosagens das medicações intracanaís..... | 15 |
| Quadro 2. Dispositivos e Parâmetros de irradiação a laser utilizado..... | 19. |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução..... | 10 |
| 2. Proposição | 12 |
| 3. Metodologia..... | 13 |
| 3.1 Delineamento experimental..... | 13 |
| 3.1.1 Tipo de estudo..... | 13 |
| 3.1.2 Variáveis..... | 13 |
| 3.1.3 Local da pesquisa..... | 13 |
| 3.2 Materiais e equipamentos utilizados..... | 13 |
| 3.3 Procedimentos laboratoriais..... | 13 |
| 3.3.1 Descongelamento das células..... | 14 |
| 3.3.2 Cultivo das células..... | 14 |
| 3.3.3 Divisão dos grupos experimentais..... | 15 |
| 3.3.4 Plaqueamento..... | 15 |
| 3.3.5 Preparo dos corpos de prova e dos eluatos..... | 16 |
| 3.3.6 Contato das células com os eluatos..... | 18 |
| 3.3.7 Irradiação a laser..... | 19 |
| 3.3.8 Teste de citotoxicidade..... | 21 |
| 3.4 Avaliação dos dados e análise estatística..... | 22 |
| 4. Resultados | 23 |
| 5. Considerações finais | 37 |
| 6. Comunicado de Imprensa..... | 38 |
| Referências Bibliográficas | 39 |

1. Introdução

O avanço técnico-científico dos instrumentos endodônticos, das técnicas de preparo, das substâncias irrigantes e dos materiais obturadores, não são capazes de erradicar todos os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares (SCR), por vezes, resistentes às substâncias utilizadas durante o preparo químico-mecânico, ou, devido a complexa morfologia dos condutos radiculares como istmos, foraminas, ramificações, reentrâncias, canais laterais, acessórios e deltas apicais^{1,2}.

Na prática endodôntica, alguns medicamentos intracanaais podem ser utilizados, como o hidróxido de cálcio P.A e o iodofórmio^{2,3}, com o principal objetivo de combater os possíveis microrganismos que resistiram a etapa de preparo do canal¹.

Para isso, os medicamentos endodônticos devem se apresentar biocompatíveis, não sendo carcinogênicos e nem genotóxicos aos tecidos perirradiculares, uma vez que os produtos da degradação desses materiais ao entrar em contato direto com o periodonto, nos casos de extravasamentos acidentais ou intencionais via forame apical, reabsorções e perfurações radiculares^{4,5}, podem resultar em irritação química e inflamação, com uma enorme variedade de mediadores químicos inflamatórios, que em altos níveis causam destruição tissular e retardam o processo cicatricial³. Por isso, esses medicamentos devem possuir a capacidade de induzir o reparo na região lesada sem interferir na osteogênese e cementogênese^{6,7}.

Como forma de conhecer os possíveis efeitos tóxicos das medicações intracanaais, estudos em animais e testes de citotoxicidade *in vitro* com diversas células do periodonto têm sido realizados^{6,8}. Dados científicos relacionados a esse assunto ainda podem ser considerados escassos na literatura, apesar de pesquisas demonstrarem que algumas medicações intracanaais apresentam citotoxicidade aos tecidos^{3,9}.

Na busca de estratégias que minimizem este problema foi proposto a associação com a Fotobiomodulação a laser (FTL), uma fonte de radiação eletromagnética com características peculiares (monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade) que a diferenciam das demais fontes de luz¹⁰. O modelo de Karu,¹¹ está entre as várias hipóteses sobre o mecanismo de ação da FTL, no qual a luz visível causa mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução e amplificação do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas) e como resultado final a fotorresposta.

A energia dos fótons emitida por um laser, quando absorvida por uma célula provoca mudanças físicas ou químicas, que desencadeiam uma cascata bioquímica de reações, que não precisam de posterior ativação de luz e que ocorrem no escuro (transdução), tendo como consequência a fotorresposta celular, caracterizada pela proliferação ou diferenciação celular ou síntese de proteína^{11,12}.

O potencial terapêutico da FTL sobre os diferentes tecidos biológicos é amplo, ao induzir efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e trófico-regenerativos¹³. Destacando-se a sua capacidade de estimular a proliferação de vários tipos celulares como fibroblastos, células epiteliais, linfócitos e odontoblastos, células estas que participam diretamente do processo de reparo¹⁴, bem como o seu efeito no estímulo a função mitocondrial, com síntese de RNA e proteínas¹⁵.

O cultivo celular tornou-se o principal modelo para substituição de animais em experimentos como forma de protegê-los e diminuir seu uso, sendo incentivado pelos comitês de ética de pesquisa em animal¹⁶. Apresentado, em sua maioria, resultados positivos da FTL^{17,18}.

Dessa forma, a cultura celular também passou a ser utilizada em pesquisas na área da Odontologia com a finalidade de analisar o processo de reparo dos tecidos e os diferentes mecanismos que causam a morte e/ou dano celular provocados por materiais odontológicos¹⁹.

Não foi observado na literatura estudos sobre a associação da FTL e medicamentos de uso endodônticos avaliando a viabilidade em fibroblastos, o que levou a ser motivo de estudo desta pesquisa com a proposição estabelecer se há uma relação entre os efeitos benéficos da FTL frente às células expostas a diferentes medicamentos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito da associação entre FTL e medicamentos intracanaís na viabilidade de fibroblastos em diferentes tempos de exposição.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo:

Avaliar, *in vitro*, através do método colorimétrico MTT, o efeito da associação entre FTL e medicamentos intracaneais na viabilidade de fibroblastos em diferentes tempos de exposição.

3. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1 TIPO DE ESTUDO

Essa pesquisa foi desenvolvida sob o modelo de um estudo in vitro, experimental e quantitativo.

3.1.2 VARIÁVEIS

Esse estudo apresenta três variáveis independentes: Fotobiomodulação a laser, medicação intracanal e o tempo experimental. A variável dependente é a viabilidade celular.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultivo celular (NCTBIO) da Faculdade de Odontologia de Pelotas-UFPEL (Pelotas-RS, Brasil) em parceria com a Universidade Federal de Sergipe-UFS (Aracaju-SE, Brasil).

3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Toda a metodologia da pesquisa foi realizada de acordo com as normas da *International Organization of Standardization* (ISO) 10993-5: 2009²⁰ organização que padroniza os testes de citotoxicidade.

Os procedimentos realizados nessa pesquisa que necessitavam de ambiente estéril foram executados dentro da câmara de fluxo laminar (ClassII Biohazard Cabenet Model 36208, Labconcorporation, Kansas City, Missouri, EUA).

A Linhagem de células permanentes fibroblásticas 3T3 - foi obtida no banco de células do Laboratório de Cultivo Celular NCTBIO da Faculdade Odontologia de Pelotas, da Universidade Federal de Pelotas- UFPEL.

3.3.1 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Para o descongelamento das células fibroblásticas, os criotubos (Global Trade Technology, São Paulo, Brasil) foram colocados em banho-maria a 37 °C por 1 minuto com 5mL de solução salina estéril com a finalidade de diluir o Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), substância utilizada para congelar as células que em temperatura ambiente é tóxica para elas. Todo esse conteúdo foi vertido para um tubo estéril tipo falcon de 15 mL (Guangzhou Jet Bio-Filtration Products Co., Ltda., Guangdong, China) e centrifugado (centrífuga - Hermll Labortechnik GmbH –Siemensstrasse 25D-78564, Wehingen, Germany) a uma temperatura de 4 °C, em 1750 rpm por 10 minuto com o objetivo de separar as células do líquido sobrenadante. Essas foram aspiradas e ressuspensas em 2 mL de meio de cultura completo - DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Cultilab, Campinas, SP, Brasil) Soro bovino fetal (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) com L-glutamina suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) e 1 % de penicilina (10⁴ UI/mL).

Em seguida, todo o conteúdo do tubo Falcon foi transferido para o frasco de cultivo de células de 25 cm² (50 mL) (Greiner Bio-one, Americana, São Paulo, Brasil) e, com o objetivo de completá-lo, foi adicionado mais 3 mL de meio de cultura completo. As células foram levadas a incubadora (Estufa CO₂ Incubator, Sanyo Scientific electric Co. Ltda., MCO-17AC, Japão) em atmosfera úmida a 37 °C, com 5 % CO₂ e 95 % de ar, conforme preconizado por Gomes-Cornélio et al. (2011)²¹.

3.3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS

Os fibroblastos 3T3 foram cultivados e mantidos em estufa de CO₂, e a cada dois dias o meio de cultura foi renovado para que as células não morressem por falta de nutrientes. O monitoramento diário do crescimento das células foi realizado utilizando microscópio invertido de fase (Nikon eclipse TS100-F Listed, Japan) onde se observou a morfologia e o comportamento dos fibroblastos (aderência e proliferação). Após a confirmação no microscópio de 80% de confluência (porcentagem de células que proliferaram na base do frasco de cultura), foi iniciado o subcultivo das células através de passagens consecutivas de frascos de cultura. Em cada passagem as células aderidas foram desprendidas da garrafa de cultura por meio de digestão enzimática utilizando 5mL de tripsina a 0,25 % (Cultilab Ltda, Campinas, SP, Brasil) e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 0,05 % (Gibco, Life Technologies Co., Carlsbad, Calif., USA), sendo que todo o conjunto foi levado a incubadora a 37 °C por 2-4 minutos²².

Em microscópio invertido de fase, observou-se o desprendimento das células e, então, inativou-se a tripsina com a adição de 5 mL de DMEN acrescido com 10 % de SBF. As células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 1250 rpm, numa temperatura de 5 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e os precipitados de células (pellets) resultantes da centrifugação foram ressuspensos em 2 mL de meio de cultura completo e depositados em novo frasco de cultura de 50 cm² com maior área para que as células pudessem se multiplicar. Dessa forma, foram realizadas três passagens no total até que se atingisse o número de células suficientes para o plaqueamento.

3.3.3 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As medicações intracanaais analisadas foram hidróxido de cálcio (HC) (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil) e iodofórmio (IO) (K-dent, Quimidrol, SC, Brasil), associadas ou não a FTL, por serem as medicações intracanaais mais utilizadas na clínica endodôntica e o veículo, inerte e estéril, selecionado para o preparo das medicações foi água destilada (Eurofarma Laboratórios LTDA, SP, Brasil). Para facilitar a análise, foram divididas em grupos, como descrito no quadro 1.

Quadro 1. Divisão dos grupos e dosagens das medicações intracanaais.

| Grupos | Componentes | Dosagem |
|-----------------------|--|-----------------|
| HC | Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada | 1 g 1.1 mL |
| IO | Iodofórmio Água destilada | 1.5 g 600 µL |
| Controle (CTR) | Meio de cultura | 200 µL/pç |

3.3.4 PLAQUEAMENTO

Nesta fase do experimento, as células foram tripsinizadas e contadas na câmara de Neubauer espelhada 0,0025 mm² (Precicolor HGB, Germany) para a determinação do número de células existentes no frasco, a fim de proceder-se a diluição necessária para o plaqueamento em placas de cultura de 96 poços com fundo chato (Prolab, São Paulo-SP, Brasil). A diluição das células foi realizada com DMEN completo de forma que 200 µL dessa suspensão celular preparada fossem semeadas em cada poço contendo 2×10^4 células/poço. Em seguida, as placas

de 96 poços foram acondicionadas em atmosfera úmida a 37 °C com 5% CO₂ por 24 h para que os fibroblastos pudessem aderir no fundo dos poços²². Vale ressaltar que durante o plaqueamento se teve o cuidado de o fazer de forma alternada para os grupos a serem irradiados (Fig 1.)

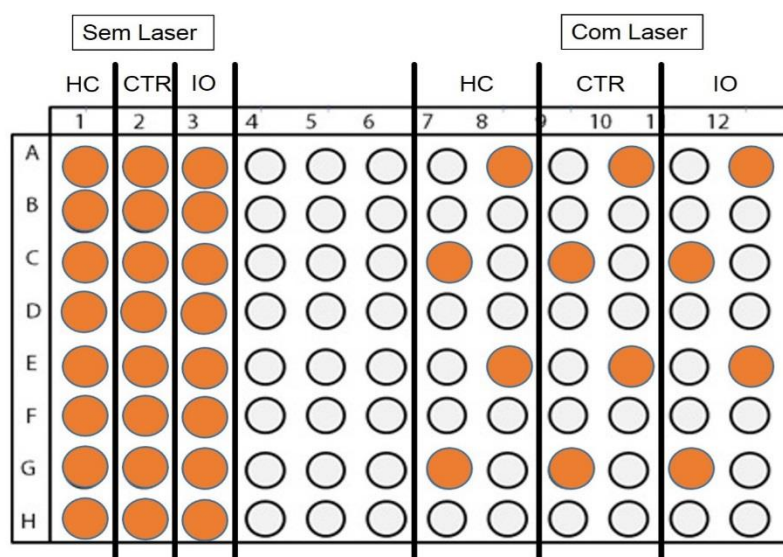


Figura1. Esquema do plaqueamento realizado (Fonte: UFS)

3.3.5 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA E DOS ELUATOS

O teste de contato indireto foi selecionado nesta pesquisa para a sensibilização das células fibroblásticas, no qual eluatos das medicações intracanais testadas foram produzidos a partir da difusão dos componentes de cada medicação intracanal para o meio de cultura e colocados em contato com as células fibroblásticas^{23,24}. Não foi realizada nenhuma diluição a partir dos eluatos originais com a finalidade de simular a rotina da prática clínica endodôntica, em que diluições não são realizadas.

Para tanto, as medicações em pó foram manipuladas sobre placa de vidro estéril com o auxílio da espátula 24F (SSWhite duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com a dosagem acima descrita, até que fosse obtida a consistência de uma pasta (Fig.2 e 3).



Fig 2. Manipulação do HC-e água destilada.

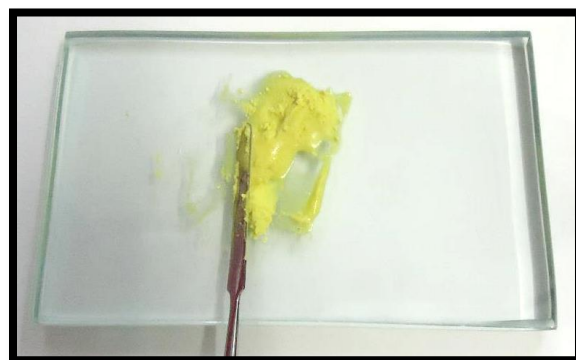


Fig 3. Manipulação IO-e água destilada.

Em seguida, os corpos de prova foram confeccionados, de modo que a forma e o volume fossem padronizados para todos os grupos. Para isso, as pastas, foram inseridas em tubos de polietileno estéreis com o diâmetro de 5 mm por 2 mm de espessura^{20,25} (fig.4).



Fig. 4 Confeção de corpos de prova

Todas as medicações foram acondicionadas em uma atmosfera úmida a 37 °C com 5 % CO₂ durante 24 h para que os corpos de provas iniciassem a presa e, facilitassem o processo de remoção dos tubos de polietileno. Após esse período, as medicações, ainda dentro dos tubos de polietileno, foram esterilizadas por meio de radiação ultravioleta, na câmara de fluxo laminar, por 1 h para evitar qualquer tipo de contaminação²⁶ (Fig. 5). Para a remoção das medicações do interior dos tubos de polietileno, foi realizada pressão no êmbolo existente no interior dos próprios tubos.



Fig.5 Esterilização dos corpos de prova (Fonte: UFPEL)

Para cada grupo, foram confeccionados três corpos de prova, posicionados no fundo de *eppendorfs*. Em seguida, 1 mL de meio de cultura DMEN suplementado com 10 % de soro bovino fetal e antibiótico foram inseridos nos *eppendorfs*, todo o conjunto foi armazenado a 37 °C por 24 h, para que os produtos ativos das medicações intracaneais pudessem se difundir pelo meio de cultura produzindo os eluatos de cada medicação intracanal^{27,28}. De cada medicação foram produzidos nove eluatos.

3.3.6 CONTATO DAS CÉLULAS COM OS ELUATOS

Na placa de cultura de 96 poços onde estavam os fibroblastos aderidos, foi removido cuidadosamente o meio de cultura presente e, 200µL do eluato de cada medicação testada foi adicionado, em cada poço. Dessa forma, cada eluato preenchia quatro poços da placa de 96 poços onde estavam fibroblastos, totalizando 36 poços por grupo²⁹.

Toda pesquisa foi realizada em triplicata de cada eluato em três experimentos independentes. Em seguida, as placas de cultura foram novamente encubadas em uma atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ pelos períodos experimentais de 24h, 48h, 72h²³.

3.3.7 IRRADIAÇÃO A LASER

Para aplicação do laser foi utilizado um aparelho Twin-laser (MMOptics®, Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) com registro na agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) n. 80051420007 e certificado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (IMETRO) sob o número NCC 2756/05, devidamente testado e calibrado pelo fabricante antes de iniciar o experimento. Deve-se ressaltar que a utilização do laser seguiu as normas de segurança da ABNT, NBR/IEC601.2.22 e IEC 60825-1/2001.

Após 1 hora em que os meios condicionados ou não pelos medicamentos colocados nas placas, foi realizado a irradiação nas placas experimentais. A aplicação foi dupla com intervalo de 6 horas³⁰. Parâmetros de irradiação descritos no quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros de irradiação para os grupos HC, CTR e IO.

| Parâmetros de irradiação | |
|--|-------------|
| Modo de emissão(CW) | Contínuo |
| Comprimento (nm) | 660 |
| Meio ativo | InGaAlP |
| Potência óptica do laser (output) (mW) | 10 |
| Potência óptica do laser (input) (mW) | 40 |
| Área do ponto de feixe (mm) | 4 |
| Área (cm^2 - $A=\pi.r^2$) (cm^2) | 0,04 |
| Densidade de potência (PD) (W/cm^2) | 0,25 |
| Densidade de energia (ED) (J/cm^2) | 3 |
| Tempo por ponto (s) | 12 |
| Energia total (J) | 0,24 |
| Energia por sessão(J) | 0,12 J/poço |
| Divergência do feixe perpendicular à junção | 17° |
| Ângulo da ponta. | 50° |

A aplicação desejada ($3\text{J}/\text{cm}^2$) foi realizada selecionando-se a potência (10mW) e calculando-se o tempo de aplicação. Nesta potência o aparelho é calibrado para mostrar o tempo com intervalos de 10s. Portanto optou-se por selecionar $5\text{J}/\text{cm}^2$ em 20s, parando o aparelho após 12s de aplicação, resultando a aplicação final na dosagem requerida.

Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada, sendo desenvolvido um suporte com o laser adaptado a este para posicionar as placas a serem irradiadas (Fig.6). Sabendo que a distância entre o laser e a superfície de aplicação é crítica, foi assim mantida a distância entre o feixe laser e as células constante. A aplicação do laser foi feita em contato e através da base das placas de cultivo celular de 96 poços, portanto o feixe laser não teve que atravessar o meio de cultura sendo aplicado diretamente na monocamada celular. As placas são compostas por poliestireno transparente e têm menos de 1 mm de espessura. A área cultivável das placas é de 3 mm^2 . Devido a característica de espalhamento da radiação laser procurou intercalar os poços para que não ocorresse sobrecarga de energia. A placa foi acomodada dentro de uma máscara escura feita de papelão preto fosco com perfurações de acordo com a localização dos poços. As perfurações foram padronizadas com auxílio de perfurador de um furo (One hole Punch 97A0, Shanghai Genmes, China) com telas internas móveis, do mesmo material usado para confecção da máscara, de um furo somente, de acordo com a posição do poço, deixando somente a área a ser irradiada exposta^{30,31}. Após as irradiações as placas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 onde foi realizado o teste de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h³⁰.

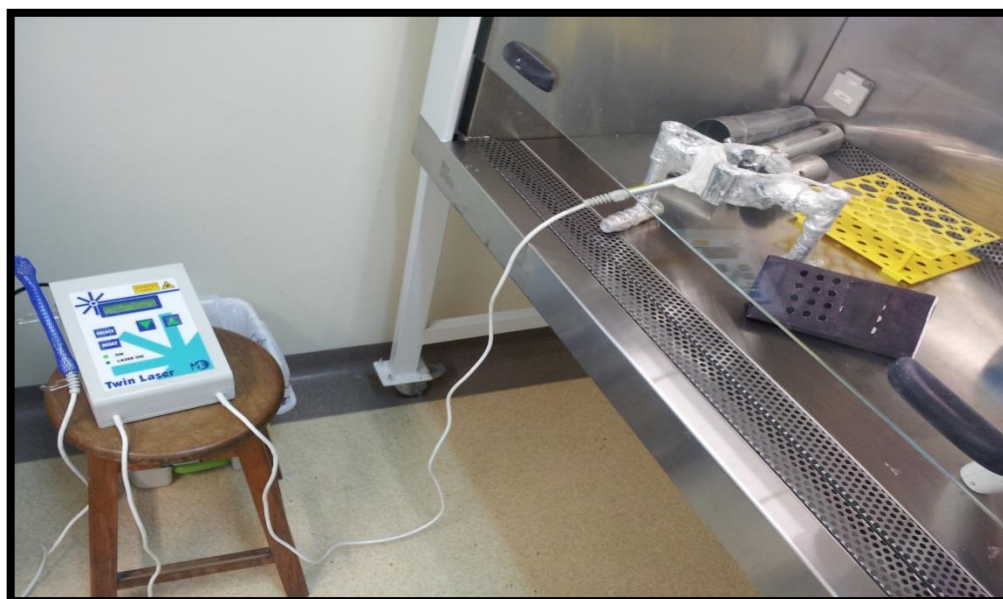


Fig.6 Padronização do experimento (Fonte:UFPEL)

3.3.8 TESTE DE CITOTOXICIDADE

A viabilidade das células foi determinada através do método colorimétrico utilizando o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio brometo] (Sigma, St. Louis, MO, EUA) com a concentração de 5 mg/mL em solução salina de tampão fosfato estéril em todos os períodos experimentais. Deve-se ressaltar que, o reagente é fotossensível, assim após a sua preparação, os tubos *ependorfs* de 2 mL contendo esta solução foram envolvidos em papel alumínio e a câmara de fluxo laminar permaneceu com a luz apagada durante todo o procedimento de colocação da solução nos poços.

Em cada período experimental, os eluatos foram cuidadosamente removidos dos poços e, em cada poço, foram dispensados 20 µL da solução reagente de MTT e 180 µL de DMEN com soro bovino fetal e antibiótico. As placas de cultura foram envolvidas em papel alumínio e encubadas em atmosfera úmida a 37 °C com 5 % CO₂ por 4 h²⁹ para que o MTT pudesse ser metabolizado. Após esse período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e desprezada, facilitando a visualização da mudança de coloração no fundo de cada poço. Essa reação ocorreu porque o sal metiltetrazólio da solução de MTT foi reduzido pelas enzimas desidrogenases dos fibroblastos, formando cristais de formazan, que possuem coloração azul escuro. Esses cristais foram dissolvidos adicionando 200 µL da solução de isopropanol acidificado com HCL a 0,04 M/l em cada poço e agitando-se (Agitador magnético Agimax- Kasvi, Curitiba, Paraná) a placa de cultura por 30 min^{32,33}. A coloração da solução variou do roxo claro até o roxo escuro, de acordo com a quantidade de cristais de formazan presentes em cada poço e, conseqüentemente, de células viáveis. Quanto mais intensa a cor da solução, menos citotóxica a substância se apresenta.

Por fim, a leitura das placas de cultura foi realizada no espectrofotômetro (Fig.7) (Microplate Spectrophotometer- EpochTM, Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) no comprimento de onda de 540 nm^{28,34} e os valores de absorbância de cada medicação obtidos foram proporcionais a intensidade da coloração de cada poço.

3.4 AVALIAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados não apresentaram normalidade e nem homogeneidade de variâncias. Nenhuma das transformações tentadas (\log_{10} , Ln, etc) corrigiu a normalidade. Assim, os dados foram colocados em postos, que é a base da análise não paramétrica, e rodou-se uma ANOVA de 3-vias seguido pelo teste de Tukey. O programa utilizado para análise estatística foi o Sigmastat 3.5.

4. RESULTADOS

Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos expostos a medicamentos endodônticos.

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da associação entre a fotobiomodulação a laser (FTL) e medicamentos intracanaís na viabilidade de fibroblastos em diferentes tempos de exposição. Para o teste citotóxico foi estabelecido a cultura de fibroblastos 3T3 com densidade celular de 2×10^4 células / poço em placas de 96 poços. Foram utilizados dois medicamentos e divididos em grupos experimentais: hidróxido de cálcio - água destilada (HC), iodofórmio - água destilada (IO) e grupo controle com células e meio de cultura (CTR), associados ou não a fotobiomodulação a laser. Eluat os dos medicamentos endodônticos foram preparados e colocados em contato com as células por períodos de 24h, 48h e 72h. Com relação a irradiação a laser foram realizadas duas sessões com intervalo de 6 horas, com laser AlGaInP emitindo radiação $\lambda 660\text{nm}$, densidade de potência de 10mW, densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ durante 12s por poço. Após cada tempo experimental, foi executado o ensaio colorimétrico, utilizando o reagente metiltetrazólio (MTT). A leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro, utilizando a densidade óptica de 540nm. Para análise estatística aplicou-se ANOVA de 3-vias seguido pelo teste de *Tukey*. Nos resultados a interação tripla não foi significativa ($P=0,053$), mas todas as interações duplas realizadas foram. Laser x medicação ($P = 0,002$); laser x tempo ($P < 0,001$); e medicação x tempo ($P < 0,001$). O CRT quando irradiado, apresentou diferença do não irradiado com uma maior taxa de viabilidade celular. Independente do uso da FTL, o controle teve maior viabilidade celular e HC a menor, apresentando-se como o mais citotóxico. Em 24h, o uso do laser reduziu a viabilidade celular, enquanto que o inverso foi observado na avaliação de 72h. Um aumento da citotoxicidade dos medicamentos endodônticos foi observado com o passar do tempo. Concluiu-se que todas medicações testadas apresentaram-se como citotóxicas, promovendo uma diminuição da viabilidade celular com o passar dos períodos experimentais, e quando associadas a FTL, foi promovido uma maior viabilidade celular para 72h.

Palavras-chaves: Citotoxicidade; Endodontia; Fototerapia; Fibroblasto

Introdução

Na endodontia, mesmo com o avanço técnico-científico dos instrumentos endodônticos, das técnicas de preparo e das substâncias irrigantes, torna-se imperioso a colocação da medicação intracanal no SCR (sistema de canais radiculares) com o objetivo de combater os possíveis microrganismos que resistiram a etapa de preparo do canal¹. Para isso, essas medicações devem se apresentar biocompatíveis, não sendo carcinogênica, e nem genotóxica aos tecidos perirradiculares, uma vez que permanecem em contato direto com o periodonto^{2,3}.

Os produtos da degradação desses materiais ao entrar em contato, com as células existentes nos tecidos perirradiculares, podem resultar em irritação química, inflamação, com uma enorme variedade de mediadores químicos inflamatórios, que em altos níveis causam destruição tissular e retardam o processo cicatricial⁴. Por isso, esses medicamentos devem possuir a capacidade de induzir o reparo na região lesada sem interferir na osteogênese e cementogênese^{5,6}.

Na busca de estratégias que minimizem este problema foi proposto a associação com a Fotobiomodulação a laser (FTL), uma fonte de radiação eletromagnética com características peculiares (monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade) que a diferenciam das demais fontes de luz. A FTL apresenta várias aplicações, buscando seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e trófico-regenerativos.^{7,8}

A FTL independente do comprimento de onda utilizado, induz na célula alterada metabolicamente uma série de reações em cascata, por meio de efeitos fotoquímicos, fotomecânicos e fotoelétricos, com efeitos primários e secundários sobre o tecido exposto a irradiação a laser⁷. Destacando-se a sua capacidade de estimular a proliferação de vários tipos celulares como fibroblastos, células epiteliais, linfócitos e odontoblastos, células estas que participam diretamente do processo de reparo⁹, bem como o seu efeito no estímulo a função mitocondrial, com síntese de RNA e proteínas¹⁰.

Não foi observado na literatura relatos sobre a associação da FTL e medicamentos de uso endodônticos avaliando a citotoxicidade em fibroblastos, o que levou a ser motivo de estudo desta pesquisa para tentar estabelecer se há uma relação entre os efeitos benéficos da FTL frente às células expostas a diferentes medicamentos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito da associação entre FTL e medicamentos intracanaís na viabilidade de fibroblastos em diferentes tempos de exposição.

Materiais e métodos

Os fibroblastos 3T3 foram obtidos no banco de células do Laboratório de Cultivo celular (NCTBIO) da Faculdade de Odontologia de Pelotas-UFPEL, Pelotas-RS, Brasil. A metodologia para observação da citotoxicidade em fibroblasto, utilizada neste estudo, foi realizada de acordo com as normas da *International Organization of Standardization* (ISO) 10993-5: 2009¹¹.

Cultura de células

As células foram cultivadas rotineiramente em frascos de 25 e 50 mm² (TPP, Trasadingen, Suíça), em meio de cultura completo - DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) e 1% de penicilina (10⁵UI/mL) (GibcoBRL, Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY). As células foram mantidas na estufa (Estufa CO₂ Incubator, Sanyo Scientific electric Co. Ltda., MCO-17AC, Japão) em atmosfera úmida a 37°C, com 5% CO₂ e 95% de ar¹². O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após atingir a confluência, o meio foi removido e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato. Tripsina 0,25% (Gibco BRL) em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Carlos Erba, ABC Lab, São Paulo, Brasil) foi adicionada em seguida e a incubação continuou durante 2-4 min. Uma solução contendo concentração de 2x10⁴ células/poço foi preparada e plaqueada em placas de cultura de 96 poços com fundo chato.

Experimento

As medicações intracanais analisadas foram hidróxido de cálcio (HC) (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil) e iodofórmio (IO) (K-dent, Quimidrol, SC, Brasil), associadas ou não a FTL, por serem as medicações intracanais mais utilizadas na clínica endodôntica. O veículo, inerte e estéril, selecionado para o preparo das medicações foi água destilada (Eurofarma Laboratórios LTDA, SP, Brasil). Para facilitar a análise, foram divididas em grupos, como descrito no quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos grupos e das dosagens das medicações intracaneais.

| Grupos | Componentes | Dosagem |
|---------------------------|--|-----------------|
| HC | Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada | 1 g 1.1 mL |
| IO | Iodofórmio Água destilada | 1.5 g 600 µL |
| Controle (CTR) | Meio de cultura Fibroblastos | 200 µL/pç |

Corpos de prova de cada medicação foram confeccionados, com forma e volume padronizados pela (ISO) 10993-5: 2009¹¹, após a presa destes foi realizada a esterilização em câmara de fluxo laminar (Class II Biohazard Cabenet Model 36208, Labconcorporation, Kansas City, Missouri, EUA) por meio de radiação ultravioleta por 1h, bem como a execução da parte experimental da pesquisa, para evitar qualquer tipo de contaminação¹³. Para cada grupo, foram confeccionados três corpos de prova, posicionados no fundo de *eppendorfs*. Em seguida, 1mL de meio de cultura DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10 % de soro bovino fetal e antibiótico foram inseridos nos *eppendorfs* e todo o conjunto foi armazenado a 37 °C por 24 h, para que os produtos ativos das medicações intracaneais pudessem se difundir pelo meio de cultura produzindo os eluatos de cada medicação intracanal^{6,14}. De cada medicação foram produzidos nove eluatos. E estes foram dispensados nos poços contendo fibroblastos aderidos. Em seguida, o meio de cultura presente foi removido por meio de aspiração, e 200 µL do eluato de cada medicação testada foi adicionado, em cada poço sendo que cada eluato preenchia quatro poços perfazendo um total de 36 poços por grupo¹⁵.

Toda pesquisa foi realizada em triplicata de cada eluato em três experimentos independentes. Em seguida, as placas de cultura foram novamente encubadas em uma atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ pelos períodos experimentais de 24h, 48h, 72h¹⁶.

Irradiação a laser

Para aplicação do laser foi utilizado um aparelho emitindo radiação com o comprimento de onda no espectro vermelho $\lambda 660\text{nm}$ – InGaAlP- Twin-laser (MMOptics®, Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) com registro na agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) n. 80051420007 e certificado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (IMETRO) sob o número NCC 2756/05, devidamente testado e calibrado pelo fabricante antes de iniciar o experimento. Deve-se ressaltar que a utilização do laser seguiu

as normas de segurança da ABNT, NBR/IEC601.2.22 e IEC 60825-1/2001. A irradiação nas placas experimentais foi realizada 1 hora após os fibroblastos serem condicionados pelos eluatos dos medicamentos colocados nas placas. Os parâmetros de irradiação utilizados neste experimento encontram-se no quadro 2. Foram realizadas duas aplicações de forma pontual com intervalo entre elas de 6 horas¹⁷ em cada poço. O aparelho é calibrado para mostrar-nos o tempo de 10 em 10s, portanto optou-se por selecionar 5J/cm² em 20s, parando o aparelho após 12s de aplicação, resultando a aplicação final na dosagem requerida. Devido a característica de espalhamento da radiação laser, procurou-se intercalar os poços para que não ocorresse sobrecarga de energia. Após as irradiações as placas foram novamente incubadas a 37° C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ e realizado o teste de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h.

Quadro 2. Parâmetros de irradiação para os grupos HC, CTR e IO.

| Parâmetros de irradiação | |
|---|-------------|
| Modo de emissão(CW) | Contínuo |
| Comprimento (nm) | 660 |
| Meio ativo | InGaAlP |
| Potência óptica do laser (output)(mW) | 10 |
| Potência óptica do laser (input) (mW) | 40 |
| Área do ponto de feixe (mm) | 4 |
| Área (cm ² - $A=\pi.r^2$)(cm ²) | 0,04 |
| Densidade de potência (PD)(W/cm ²) | 0,25 |
| Densidade de energia (ED)(J/cm ²) | 3 |
| Tempo por ponto(s) | 12 |
| Energia total(J) | 0,24 |
| Energia por sessão(J) | 0,12 J/poço |
| Divergência do feixe perpendicular à junção | 17° |
| Ângulo da ponta. | 50° |

Citotoxicidade

A viabilidade das células foi determinada através do método colorimétrico utilizando o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo] com a concentração de 5 mg/mL em solução salina de tampão fosfato estéril em todos os períodos experimentais. Em cada período experimental, os eluatos foram cuidadosamente removidos dos poços e, em cada poço, foram dispensados 20 µL da solução reagente de MTT e 180 µL de DMEN com soro bovino fetal e antibiótico. As placas de cultura foram envolvidas em papel alumínio e encubadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por 4h¹⁵ para que o MTT pudesse ser metabolizado. Após esse período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e desprezada, facilitando a visualização da mudança de coloração no fundo de cada poço. Por fim, a leitura das placas de cultura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm¹⁴ e os valores de absorbância de cada medicação obtidos foram proporcionais a intensidade da coloração de cada poço.

Análise estatística

Os dados não apresentaram normalidade e nem homogeneidade de variâncias. Nenhuma das transformações testadas (log₁₀, Ln, etc) corrigiu a normalidade. Assim, os dados foram colocados em postos, que é a base da análise não paramétrica, e foi aplicado ANOVA de 3-vias seguido pelo teste de *Tukey*. O programa utilizado para análise estatística foi o Sigmastat 3.5.

Resultados

ANOVA demonstrou efeito de tratamento para os fatores ‘medicação’ ($P < 0,001$) e ‘tempo’ ($P < 0,001$), mas não houve efeito do fator ‘laser’ ($P = 0,949$). Todas as interações duplas entre fatores foram significativas (laser x medicação ($P = 0,002$); laser x tempo, ($P < 0,001$); e medicação x tempo, ($P < 0,001$)). A interação tripla não foi significativa ($P=0,053$). As tabelas de 1 a 3 apresentam os resultados de todas as interações duplas. A tabela 1 mostra os resultados obtidos para interação entre medicamentos e o uso do laser. O grupo controle, quando irradiado, apresentou maior viabilidade celular que o não irradiado. O inverso ocorreu para IO onde maior viabilidade foi observada na ausência de irradiação. Já para HC, a irradiação não afetou a viabilidade celular. Independentemente do uso de laser, o controle teve maior viabilidade celular e os grupos com a pasta de hidróxido de cálcio a menor.

Tabela 1. Resultado da citotoxicidade em mediana (1º/3º quartil) para interação medicação x uso de laser em unidades de absorbância.

| Medicação | Laser | |
|-----------|---------------------|---------------------|
| | Não | Sim |
| Controle | 1,08 (0,74/1,35) Ba | 1,51 (0,97/1,88) Aa |
| HC | 0,28 (0,26/0,32) Ac | 0,28 (0,26/0,33) Ac |
| IO | 0,70 (0,29/1,34) Ab | 0,35 (0,27/0,87) Bb |

Letras distintas (maiúsculas nas linhas, minúsculas nas colunas) indicam diferença estatística (P<0.05).

A Tabela 2 apresenta os resultados da interação entre ‘tempo’ e ‘laser’. Em 24h, o uso de laser reduziu a viabilidade celular, enquanto que o inverso foi observado na avaliação de 72h. Não houve diferença entre o uso de laser para 48h. Na ausência de laser, maior viabilidade celular foi observada com 24h e os menores valores para 72h. Nenhuma diferença foi observada entre os tempos na presença de irradiação com laser. Já na ausência da irradiação com laser foi observado uma diminuição da viabilidade com o passar dos períodos experimentais.

Tabela 2. Resultado da citotoxicidade em mediana (1º/3º quartil) para interação tempo x uso de laser em unidades de absorbância.

| Tempo | Laser | |
|-------|---------------------|---------------------|
| | Não | Sim |
| 24h | 1,13 (0,35/1,49) Aa | 0,77 (0,25/1,43) Ba |
| 48h | 0,69 (0,34/1,03) Ab | 0,49 (0,32/0,83) Aa |
| 72h | 0,29 (0,27/0,33) Bc | 0,31 (0,27/1,27) Aa |

Letras distintas (maiúsculas nas linhas, minúsculas nas colunas) indicam diferença estatística (P<0.05).

A tabela 3 mostra os resultados da interação entre ‘medicamento’ e ‘tempo’. Em todos os tempos, os medicamentos apresentaram menor viabilidade que o controle. Para 24 e 48h, IO apresentou maiores valores que HC. Já em 72hs, não houve diferença entre HC e IO. Para o controle, 24h apresentou maiores valores que 48h, enquanto que 72 h não diferiu de nenhum dos outros tempos de avaliação. Nenhuma diferença entre os tempos de avaliação foi observada para HC. Já para IO, 72h apresentou a maior citotoxicidade, sem diferença entre 24 e 48h.

Tabela 3. Resultado da citotoxicidade em mediana (1º/3º quartil) para interação medicação x tempo em unidades de absorbância.

| Medicação | Tempo | | |
|-----------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 24h | 48h | 72h |
| Controle | 1,44 (1,10/1,86) Aa | 1,08 (0,72/1,43) Ba | 1,10 (0,39/1,50) Aba |
| HC | 0,32 (0,25/0,35) Ac | 0,28 (0,27/0,32) Ac | 0,27 (0,26/0,29) Ab |
| IO | 1,21 (0,84/1,51) Ab | 0,66 (0,52/0,82) Ab | 0,28 (0,26/0,29) Bb |

Letras distintas (maiúsculas nas linhas, minúsculas nas colunas) indicam diferença estatística (P<0.05).

Discussão

A FTL vem despertando cada vez mais o interesse da Odontologia, com aplicabilidade cada vez maior no âmbito odontológico. Usada como estratégia coadjuvante nos processos inflamatórios, com o objetivo de modular os efeitos da inflamação, bem como, estimular o reparo de lesões ósseas, musculares e neurais^{8,18-20}. Utilizada neste estudo, com a perspectiva de minimizar possíveis efeitos citotóxicos de medicamentos endodônticos em contato com células presentes na região periapical. O parâmetro de irradiação utilizado nesta pesquisa teve como base o fato de que, a irradiação no comprimento de onda visível é absorvida pelos fotorreceptores das mitocôndrias, resultando em efeitos fotoquímicos, desencadeando uma cascata de eventos metabólicos que tem como resposta final a biomodulação²⁰. Estudos prévios^{17,21} relatam que a densidade de energia utilizada neste estudo apresenta resultados positivos no estímulo a fibroblastos aumentando o metabolismo celular, o número de células viáveis e a sua proliferação.

O cultivo celular passou a ser muito utilizado na odontologia, permitindo avaliar, separadamente, cada tipo celular envolvido no processo de reparo. Neste estudo *in vitro*, optou-se por utilizar fibroblastos, por se apresentarem como um típico modelo de células em ensaios de citotoxicidade devido ao seu rápido e fácil crescimento²². Estas células apresentam-se como os maiores constituintes do tecido conjuntivo, sendo o tipo de célula mais predominante no ligamento periodontal e os maiores produtores de colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e glicoproteínas – componentes da matriz extracelular⁵.

Nos ensaios de toxicidade utilizando células, as substâncias, a serem avaliadas, podem ser colocadas em contato direto ou indireto com a cultura celular, para sensibilizá-la²³. No contato indireto, utilizam-se os eluatos preparados a partir das medicações experimentais, baseando-se no fato que, quando colocadas no interior dos condutos radiculares durante a prática clínica, os componentes das medicações são liberados e diluídos nos fluidos tissulares, da mesma forma que ocorre com as substâncias que se difundem para o meio de cultura durante a preparação dos eluatos em pesquisas *in vitro*²⁴.

Para análise dos grupos experimentais quanto a citotoxicidade foi utilizado o método colorimétrico MTT para avaliar a viabilidade celular. Esse ensaio, de acordo com Freshney²⁵, determina indiretamente a viabilidade celular, além de ser o mais utilizado em pesquisas com esse objetivo, por apresentar simplicidade de execução, rapidez, precisão e possibilidade de ser reproduzido²⁶.

Os resultados encontrados nesta pesquisa, apresentaram diferença significativa entre o grupo CTR não irradiado e irradiado, apresentando uma maior viabilidade nas células irradiadas. Para interação “tempo x uso do laser”, na ausência da FTL, observou-se uma tendência a diminuição na viabilidade celular com o passar dos períodos experimentais atingindo os menores valores em 72h, demonstrando um aumento da citotoxicidade dos medicamentos com o passar do tempo. Diferentemente, na presença da FTL esta alteração na viabilidade celular não foi observada. Este fato parece estar relacionado a capacidade da FTL promover o aumento na concentração de ATP, estimulando a proliferação de fibroblastos e consequentemente a liberação de fatores de crescimento celular (PDGF, IGF-I, TGF) é favorecida^{27,28}.

O mecanismo biológico básico por trás dos efeitos da FTL ocorre através da absorção de luz vermelha por cromóforos mitocondriais, em particular, citocromo C oxidase (CCO), que está contido na cadeia respiratória localizado dentro da mitocôndria. Em seguida, uma cascata de eventos ocorrem nesta, o que leva a bioestimulação de vários processos, levando a um aumento da atividade enzimática, da respiração mitocondrial, do transporte de elétrons e produção de adenosina trifosfato(ATP). A FTL por sua vez, altera o redox celular, que induz a ativação de numerosas vias de sinalização intracelular, e altera a afinidade de fatores de transcrição relacionados com a proliferação celular, sobrevivência, reparação de tecidos e de regeneração⁷.

Em relação a interação “medicamento x tempo”, os grupos HC e IO apresentaram menor viabilidade que o controle, indicando citotoxicidade dos medicamentos. A pasta de HC

apresentou-se mais citotóxica que IO nos tempos de 24 e 48h, e, quando comparada ao grupo controle menor viabilidade foi observada em todos os tempos experimentais, porém, quando da associação com o laser, observou-se que a FTL não promoveu mudanças positivas em relação ao resultado. Este fato pode estar relacionado ao aumento do pH^{16,29,30} que promove desnaturação enzimática e destruição da membrana celular, levando a célula à morte²⁶, impossibilitando destarte, a ação da FTL.

Este fato parece estar relacionada com a ação direta do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com a célula, promovendo alterações físico-químicas, clivagem de glicoproteínas, desnaturação de proteínas e formação de áreas de necrose com uma rápida precipitação de cristais, depositando íons cálcio e fósforo e induzindo assim a formação de calcificação distrófica³¹. Em relação a este dado, no trabalho *in vivo* realizado por Ribeiro et al.³² focos de necrose de coagulação e calcificação distrófica foram provocados pela ação do hidróxido de cálcio quando em contato direto com o tecido. Pode-se observar em outros estudos^{33,34} que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apresentou alta citotoxicidade em 24h, com proliferação celular com o passar do tempo em contato com as células. Essa discrepância pode estar relacionada a diversidade de etapas, tipo celular utilizado e metodologias existentes entre as pesquisas.

Já em 72hs, não houve diferença entre HC e IO. Resultados semelhantes foram encontrados por Sarigol et al.³⁵, no qual, uma substância à base de iodofórmio apresentou aumento da citotoxicidade em fibroblastos com o passar do tempo. O que pode estar relacionado a, provavelmente, função dos componentes do IO agirem mais sobre tecidos necróticos, além de sua ação tixotrópica, que é a capacidade de uma substância sólida absorver líquidos³⁶. Tornando-se mais lenta a evidência de sua citotoxicidade. Daniel³⁷ em seu estudo, observou em 24hs maior agressividade do iodofórmio quando comparado ao hidróxido de cálcio, porém, para Machado (2007)³⁸ as diferentes interações celular existentes nos tecidos podem justificar resultados histológicos que demonstram boa tolerância e excelente performance clínica do Iodofórmio.

Já o grupo IO, na ausência de irradiação a laser, apresentou uma maior viabilidade celular do que os submetidos a FTL. Os mecanismos biomoduladores da terapia a laser ainda não são totalmente compreendidos. Supõe-se que alguns efeitos da associação da FTL e IO podem estar relacionados ao aumento da produção da espécie reativa oxigênio singlet o qual reage produzindo o peróxido de hidrogênio, modulando a atividade redox da mitocôndria e/ou o estado redox da célula podendo estimular o ciclo celular e a síntese de proteína em concentrações mais baixas, mas que são muito citotóxicos em concentrações mais elevadas³⁹.

Conclui-se que todas as medicações testadas são citotóxicas, com uma diminuição da viabilidade celular nos períodos experimentais, mas quando da associação com a FTL uma maior viabilidade celular foi observada para 72h.

Referências Bibliográficas

1. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL De, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J*. 2009 Jan;20(1):32–6.
2. Heward S SC. Effects of intracanal mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide during four weeks on pH changes simulated root surface resorption defects: An in vitro study using matched pairs of human teeth. *J Endod*. 2011;37:40–4.
3. Marão HF, Panzarini SR, Aranega AM, Sonoda CK, Poi WR, Esteves JC SP. Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dent Traumatol*. 2012;28:306–13.
4. Petel R, Moskovitz M, Tickotsky N, Halabi A, Goldstein J H-HY. Cytotoxicity and proliferative effects of iodoform-containing root canal-filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. *Arch Oral Biol*. 2013;58:75–81.
5. Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Almeida JF a, Ferraz CCR, Gomes BPF a, Zaia a a. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J*. 2012;45(1):49–56.
6. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller K-A, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*. 2009;42(3):227–37.
7. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013;32(1):41–52.
8. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J*. 2010.
9. Soares DM, Ginani F, Henriques AG, Barboza CAG. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci*. 2013, 7.
10. Franassis B.O, Rocha G.G. Low-level ligth therapy (LLLT) in the human movement optimization and performance. *Rev Acta Bras do Mov Hum*. 2014;4(1):52–60.
11. International Organization for Standardization ISO 10993 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2009.
12. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPF a, Zaia A a. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013;39(2):274–7.

13. Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, et al. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *Int Endod J*. 2011;44(2):154–61.
14. Bin C V, Valera MC, Camargo SE a, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. Elsevier Ltd; 2012;38(4):495–500.
15. Yoshino P, Nishiyama CK, Cristina K, Santos CF, Sipert CR. In Vitro Cytotoxicity of White MTA , MTA Fillapex ® and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. 2013;24:111–6.
16. Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A TS. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int*. 2009;10:55–61.
17. Pereira AN, Eduardo CDP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):263–7.
18. Rosa CB, de Castro ICV, Júnior, Pinheiro ALB, et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy (LPT) on bone defect grafted with biphasic ceramic on rats with iron deficiency anemia: Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci*. 2014;
19. Oron A, Oron U, Chen J, Eilam A, Zhang C, Sadeh M, et al. Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke*. 2006;37:2620–4.
20. Riso AADL. Proliferação e viabilidade de fibroblastos após irradiação sequencial em baixa intensidade por dois comprimentos de onda (660 e 780 nm). *autarquia associada à universidade de são paulo*; 2009.
21. Basso FG, Pansani TN, Turriani APS, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa C a. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent*. 2012;2012:719452.
22. Hirschman WR, Wheeler M a, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod*. Elsevier Ltd; 2012;38(3):385–8.
23. Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA ZA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblasts cells by four root canal sealers. *J Endod*. 2012;45:49–56.
24. Lessa FCR, Aranha AMF, Hebling J SCC. Cytotoxic effects of White-MTA and MTA-BIO cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). *Braz Dent J*. 2010;21:24–31.
25. Freshney R. . Cytotoxicity In: Freshney RI *Biology of the cultured cell Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4^a ed. New York, Willey; 2000. p. 332–45.

26. Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JF a, Ferraz CCR, Gomes BPF a, Zaia a a. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J*. 2012;45(9):815–20.
27. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):179–84.
28. Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of lowintensity laser radiation. *Lasers Life Sci*. 1988;v.2(n.1):p.53–74.
29. Guigand M, Pellen-Mussi P, Goff A Le, Vulcain J-M, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J Endod*. 1999 Jun;25(6):419–23.
30. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FLVC, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol*. 2012;28(4):320–3.
31. Queiroz AM de, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LAB da. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci*. 2005;13:126–30.
32. Ribeiro MAG; Tomaz PJS ; Farias MP; Piva MR;Albuquerque júnior RLC; effect of laser therapy in inflamed tissue by medications based on iodoform laser therapy in inflamed tissue. *Am J Appl Sci*. 2013;10(1):81–8.
33. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. Elsevier Ltd; 2012;38(10):1372–5.
34. Barbosa SV, Barroso CMS RP. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants Containing Calcium Hydroxide and Sodium Lauryl Sulphate on Fibroblasts Derived From Mouse L929 Cell Line. *Braz Dent J*. 2009;20:118–21.
35. Sarigol CG, Cogulu D, Oncag O, Deliloglu IG. Cytotoxic Effects of Primary Tooth Root Canal Filling Materials on L929 Cell Line. *J Dent Child*. 2010;72–7.
36. Daniel RLDP, Jaeger MMM MM. Emprego do iodofórmio em Endodontia - revisão da literatura. *RPG Rev Pos-gr*. 1999;6(2):175–9.
37. Daniel RLDP. Análise comparativa da citotoxicidade in vitro do Iodofórmio e do hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes . Universidade de São Paulo; 1998.
38. MEL. M. Endodontia da Biologia à Técnica. Santos. São Paulo; 2007.
39. Vladimirov, Y.A., Osipov, N.A., and Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 2004;69(1):81–90.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da metodologia utilizada, conclui-se que todas as medicações intracanaís mostraram-se citotóxica. O hidróxido de cálcio foi o mais citotóxico dos medicamentos testados em todos os tempos experimentais, e, a pasta de iodofórmio apresentou menor citotoxicidade na primeiras 48hs, em 72h não houve diferença estatística entre os grupos IO e HC. A FTL amenizou os efeitos citotóxico das medicações intracanaís quando da associação destas duas terapias, pois nenhuma diferença foi observada entre os tempos na presença de irradiação com laser. Já na ausência da irradiação com laser foi observado uma diminuição da viabilidade com o passar dos períodos experimentais. A FTL promoveu uma maior viabilidade celular em 72h.

6. COMUNICADO DE IMPRENSA (PRESS RELEASE)

Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos expostos a medicamentos endodônticos.

A Odontologia tem passado por uma série de avanços, despertando cada vez mais o seu interesse pela fotobiomodulação a laser (FTL), uma fonte de radiação eletromagnética com características peculiares (monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade) que a diferencia das demais fontes de luz, com o seu uso sendo testado na aplicação de diversas especialidades odontológicas. A FTL apresenta várias aplicações, buscando seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e trófico-regenerativos. Sugerida neste estudo como uma estratégia coadjuvante no tratamento de canal, na tentativa de minimizar possíveis efeitos citotóxicos de medicamentos endodônticos em contato com células presentes na região de ápice dental.

Na dissertação apresentada pelo discente Gustavo Danilo Nascimento Lima, orientado pela Prof.^a Dr^a. Maria Amália Gonzaga Ribeiro, avaliou-se, por meio de estudo *in vitro*, o efeito da associação entre a fotobiomodulação a laser (FTL) e medicamentos intracanaís na viabilidade de fibroblastos, nos diferentes tempos de exposição 24, 48 e 72hs. Os resultados deste estudo mostraram que todas as medicações testadas apresentaram citotoxicidade crescente com o passar do tempo, e a associação com a FTL apresentou resultados positivos promovendo uma maior viabilidade celular no período de 72hs.

É importante considerar que resultados positivos ou negativos neste tipo de estudo nem sempre reproduzem diretamente os mesmos resultados em seres vivos, já que outras variáveis estão presentes neste último modelo, no entanto, servem de base para novos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL De, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J*. 2009;20(1):32–6.
2. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB T-FM. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*; *Int Endod J*. 2012;45:311–6.
3. Petel R, Moskovitz M, Tickotsky N, Halabi A, Goldstein J H-HY. Cytotoxicity and proliferative effects of iodoform-containing root canal-filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. *Arch Oral Biol*. 2013;58:75–81.
4. Heward S SC. Effects of intracanal mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide during four weeks on pH changes simulated root surface resorption defects: An in vitro study using matched pairs of human teeth. *J Endod*. 2011;37:40–4.
5. Marão HF, Panzarini SR, Aranega AM, Sonoda CK, Poi WR, Esteves JC SP. Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dent Traumatol*. 2012;28:306–13.
6. Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Almeida JFA, Ferraz CCR, Gomes BPFA ZA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblasts cells by four root canal sealers. *J Endod*. 2012;45:49–56.
7. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H SG. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*. 2009;42:227–37.
8. Zeferino EG, Bueno CES, Oyama LM RD. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J*. 2010;43:843–8.
9. Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M ST. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. *J Endod*. 2010;36:260–3.
10. Pinheiro, ALB; Brugnera Júnior, A; Zanin FAA. Aplicação do Laser na Odontologia. São Paulo: Santos, 2010.
11. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Heal Phys*. 56:691–704.
12. Ribeiro, M. S.; Zezell DM. Laser de baixa intensidade. In: Gutknecht, N.; Eduardo, C. P. A Odontologia e o laser – Atuação do laser na especialidade odontológica. Quintessen. São Paulo – SP; 2004.
13. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013;32(1):41–52.

14. Soares DM, Ginani F, Henriques AG, Barboza CAG. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci.* 2013.
15. Franassis B.O, Rocha G.G. Low-level light therapy (LLL) in the human movement optimization and performance. *Rev Acta Bras do Mov Hum.* 2014;4(1):52–60.
16. Moraes AM, Augusto EFP CR. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. Rocca. São Paulo; 2007.
17. Loevschall H A-BD. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994;14:347–54.
18. Kreisler M, Christoffers A B, Al-Haj H, Willershausen B d’Hoedt B. Low level 809-nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;30:365–9.
19. Lessa FCR, Aranha AMF, Hebling J SCC. Cytotoxic effects of White-MTA and MTA-BIO cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). *Braz Dent J.* 2010;21:24–31.
20. Standard I. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices- tests for in vitro cytotoxicity. 2009.
21. Gomes Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011.
22. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013.
23. Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A TS. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int.* 2009;10:55–61.
24. Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JF a, Ferraz CCR, Gomes BPF a, Zaia a a. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J.* 2012.
25. De Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Costa CA de S. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007.
26. Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, et al. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *Int Endod J.* 2011.
27. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller K-A, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009.

28. Bin C V, Valera MC, Camargo SE a, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* Elsevier Ltd; 2012;38(4):495–500.
29. Yoshino P, Nishiyama CK, Cristina K, Santos CF, Sipert CR. In Vitro Cytotoxicity of White MTA , MTA Fillapex ® and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. 2013;24:111–6.
30. Pereira AN, Eduardo CDP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002.
31. Damante C andreotti. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (lilt) na expressão de fatores de crescimento da família fgf por fibroblastos gengivais humanos. 2007.
32. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010.
33. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod.* 2009.
34. Hirschman WR, Wheeler M a, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* Elsevier Ltd; 2012.